ANÁLISE DE ESTRATÉGIAS METODOLÓGICAS PARA ACESSAR A REGIÃO D-LOOP DO GENOMA MITOCONDRIAL DE MARSUPIAIS NEOTROPICAIS.

Júlia G. Arata[1]*, Elisa V. Branco[1], Marcus V. Brandão[3], Ana Cláudia Lessinger[2] e Ana Paula Carmignotto[3].

1. Estudante de IC da Universidade Federal de São Carlos – campus Sorocaba - UFSCar; *julia.galanakisarata@gmail.com
2. Docente Laboratório de Genética Molecular Animal, DBio,CCHB, UFSCar, Sorocaba, SP.
3. Docente Laboratório de Diversidade Animal, DBio, CCHB, UFSCar, Sorocaba, SP

Palavras Chave: *DNAmt, Primers, Didelphidae.*

Introdução

A principal região não codificadora do genoma mitocondrial animal é a Região Controladora da Replicação (RC) ou, *D-loop* (como denominada em vertebrados), cuja função está associada a processos regulatórios para iniciação da replicação e transcrição do genoma (Clayton, 1982). Esta região apresenta evolução rápida em mamíferos devido à presença de trechos de sequências hipervariáveis, livre de restrição funcional (Pesole, *et al.*1999). Entretanto, devido à dinâmica evolutiva do genoma mitocondrial, o acesso às sequências da RC pode ser um desafio metodológico para algumas espécies. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma combinação de estratégias baseadas em PCR - incluindo desenho de novos *primers* táxon-específicos, *nested*-PCR e PCR de longa extensão - para promover o acesso a esta região.

A história evolutiva de marsupiais Neotropicais (família Didelphidae) abriga complexos de espécies carentes de resolução filogenética e taxonômica. O acesso à Região *D-loop* pode contribuir para resolver estes conflitos fornecendo um marcador molecular com nível de variabilidade genética informativo.

Resultados e Discussão

Neste estudo foram analisados espécimes representando 11 taxa de Didelphidae: *Cryptonanus agricolai*, *C. chacoensis*, *Gracilinanus agilis*, *Marmosa murina*, *M. constantiae budini*, *M. c. constantiae*, *M. demerarae*, *M. paraguayana*, *Monodelphis ronaldi*, *Thylamys macrurus* e *T. karimii.*

Estratégias metodológicas:

1) Novos *primers* mapeados em sítios flanqueadores da RC: Os *primers* 5 e 7 (Figura 1) hibridam em trechos conservados identificados após alinhamentos de sequências ortólogas do gene CYTB dos genomas mitocondriais disponíveis em Didelphidae na plataforma MetAMiGA (www.amiga.cbmeg.unicamp.br). A mesma estratégia foi realizada para seleção dos *primers* 6 e 8 na extremidade 5' do gene *srRNA* (12S). Resultados da amplificação com estes primers estão na Tabela 1.

2) Novos *primers* XL PCR de longa-extensão: A partir da análises comparativas de trechos de sequências conservadas dos genes *lrRNA* (16S) e *cox3* formam definidos *primers* para amplificação do DNAmt em 2 amplicons, um deles incluindo a RC (*primers* 2 e 3 – Figura 1). A temperatura de hibridação destes *primers* foi definida em 65°C, testando-se as combinações 1 + 2 e 3 + 4 em amplificações curtas (1.250 pb e 650 pb, respectivamente), para padronização das condições do PCR de Longa Extensão.

3) PCR de Longa Extensão *Nested*-PCR: A combinação dos primers 1 + 4 gerou um amplicon de ~8.000pb (Tabela 1). A reação para o amplicon contendo a RC está sendo padronizada. A estratégia baseada em *nested* PCR não apresentou resultados conclusivos.

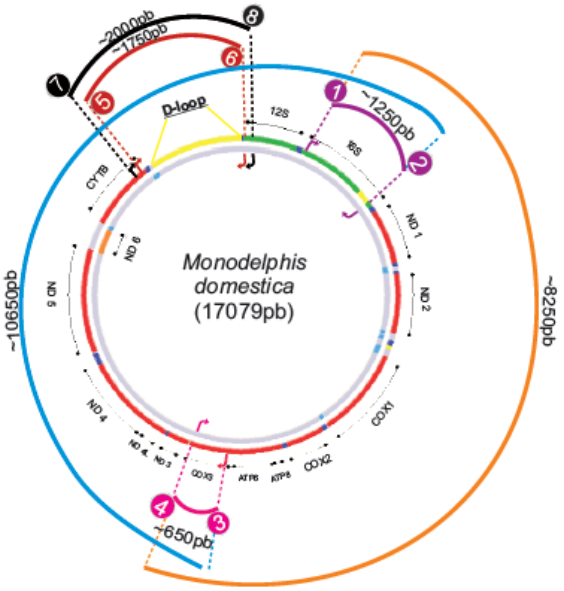

Figura 1. Mapeamento dos novos primers e combinações com base no DNAmt de *Monodelphis domestica* NC_006299.

Tabela 1. Resultados dos PCRs com suas respectivas combinações dos primers e tamanho da região obtida.

Primers	Amostras	Amplicons
5 e 6	*C. chacoensis*	3.000 pb
7 e 8	*M. c. constantiae*; *M. paraguayana*; *M. ronaldi*;	2.500 pb
1 e 2 primer XL	*C. agricolai*; *G. agilis*; *M. paraguayana*; *M. ronaldi*; *T. karimii*	1.250pb
3 e 4 primer XL	*C. agricolai*; *G. agilis*; *M. paraguayana*; *M. ronaldi*; *T. karimii*	650pb
1 e 4 primer XL	*M. murina*; *M. paraguayana*	8.000 pb +inespecíficos

Conclusões

1) Todos os *primers* novos testados neste estudo foram úteis para recuperar regiões-alvo do DNAmt, entretanto não funcionaram para todas as espécies analisadas;

2) A amplificação por PCR de longa-extensão foi eficiente para recuperar um dos amplicons do DNAmt (região menos instável por não conter a RC);

3) Estratégias de Nested-PCR não se mostraram eficientes até o momento e sugere-se que sejam testadas utilizando produtos de PCR de Longa Extensão como molde.

Agradecimentos

CNPq e FAPESP

Clayton DA (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. Cell 28:693–705

Pesole, G., Gissi C., Chirico,A., Saccone, C. (1999) Nucleotide Substitution Rate of Mammalian Mitochondrial Genomes. J Mol Evol 48:427–434.